

## 明細書

### 骨の再生方法

#### 技術分野

本発明は、骨の再生方法に関する。より詳細には、本発明は、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を移植することにより骨を再生する方法に関する。本発明はさらに、上記方法により再生された骨を用いて患者を治療する方法に関する。

#### 背景技術

骨折はあらゆる年齢層の人に発生し得る障害である上、長期の治癒期間を要する場合が多い。患者の日常生活に支障をきたすため、骨折を早期に治癒させることは、QOLの点からも重要な課題である。特に高齢者の骨折の場合、寝たきりになる可能性も高く、社会的にも経済的にも重要な問題となっている。

骨欠損としては、例えば、歯槽堤萎縮症、また、腫瘍、のう胞の摘出後に生じた骨欠損、更に外傷や先天性疾患による骨欠損（口蓋裂等）などが挙げられ、骨移植や骨延長、もしくは人工骨による治療がなされているが、必ずしも十分な効果をあげてはおらず、また、ドナーサイトの問題（患者の負担やリスク等）も残されている。骨折、骨欠損の治療に関しては、例えば、BMP、FGF、TGF- $\beta$ などの骨形成促進因子の利用についての検討がなされているが、この様なペプチド性因子は生体内で速やかに代謝されて失活してしまうか、もしくは、至適濃度を維持することが困難なため、十分な治療効果を得られない場合が多い。更に、この因子類の安定性を改善する製剤等の検討もなされているものの、臨床での応用に満足できるものはまだ得られていない。

また、骨形成促進作用を示す低分子化合物、例えばプロスタグランジン類、ベンジルホスホン酸誘導体、フェノールスルホフタレン誘導体、ビタミンD誘導体類などについても検討がなされているが、副作用を有していたり、臨床的に骨折や骨欠損の治療を行うためには未だ不十分な能力しか有していないのが現状であ

る。

これらの問題点を根本的に解決するために、近年、同種または自家骨由来の細胞を用いた治療の検討がなされている。すなわち、骨形成の中心的役割を担う骨芽細胞や、骨髄由来の未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させたものを、適当な担体と共に骨折部位または骨欠損部位などに移植する技術が試みられている (Ohgushi et al., J. Biomed. Mat. Res. (48), 913-927, 1999)。同技術は、副作用の少ない有効な技術として期待されるが、形成される骨量や治癒期間等の点で未だ不十分な技術である。

通常、上記した通り、細胞を用いて骨を形成する場合、組織を形成する芽細胞、もしくはその前駆細胞又は幹細胞等の間葉系細胞のみを用いており、上皮系細胞を共存させることにより骨の形成を著しく促進させる技術については、これまで全く知られていなかった。

## 発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、骨を効果的に再生する方法を提供すること、より具体的には、骨の欠損又は損傷を有する患者を治療することを可能にする骨の再生方法を提供することを解決すべき課題とした。さらに本発明は、再生した骨を用いて骨の欠損又は損傷を有する患者を治療する方法を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養及び／又は移植することにより、間葉系細胞の分化誘導が促進され、骨の再生を促進できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養することを含む、骨の再生方法が提供される。好ましくは、担体上で、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養する。

本発明の別の態様によれば、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させることを含む、骨の再生方法が提供される。好

ましくは、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を担体と一緒に動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させる。

好ましくは、上皮系の細胞として、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞を使用することができ、間葉系細胞として、象牙芽細胞、歯髄細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞、又は間葉系の幹細胞を使用することができる。好ましくは、再生する骨は、顎骨もしくは歯槽骨である。

本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の方法により再生された骨が提供される。本発明のさらに別の態様によれば、上記した本発明の方法により再生した骨を、骨の欠損又は損傷を有する患者に移植することを含む、治療方法が提供される。本発明のさらに別の態様によれば、(1) 内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞から選択される上皮系細胞；(2) 象牙芽細胞、歯髄細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞あるいは間葉系の幹細胞から選択される間葉系細胞；及び(3) 担体を含む、骨再生用組成物が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、歯胚間葉系細胞のみを担体に播種して移植し、11週間後に取り出した移植体を示す。

図2は、歯胚間葉系細胞のみを担体に播種して移植し、11週間後に取り出した移植体の組織像（ヘマトキシリニーエオジン染色）を示す。

図3は、培養した歯胚間葉系細胞のみを担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体の組織像（ヘマトキシリニーエオジン染色）を示す。

図4は、歯胚上皮系細胞と歯胚間葉系細胞の混合物を担体に播種して移植し、4週間後に取り出した移植体を示す。

図 5 は、歯胚上皮系細胞と歯胚間葉系細胞の混合物を担体に播種して移植し、4 週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリニーエオジン染色)を示す。

図 6 は、歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を播き分けて担体に播種して移植し、4 週間後に取り出した移植体を示す。

図 7 は、歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を播き分けて担体に播種して移植し、4 週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリニーエオジン染色)を示す。

図 8 は、歯胚間葉系細胞を担体に播種したもの口腔粘膜上皮細胞シートで包んで移植し、4 週間後に取り出した移植体を示す。

図 9 は、歯胚間葉系細胞を担体に播種したもの口腔粘膜上皮細胞シートで包んで移植し、4 週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリニーエオジン染色)を示す。

図 10 は、培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞の混合物を担体に播種して移植し、4 週間後に取り出した移植体を示す。

図 11 は、培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞の混合物を担体に播種して移植し、4 週間後に取り出した移植体の組織像(ヘマトキシリニーエオジン染色)を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。本発明による骨の再生方法は、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養、及び／又は移植動物に移植することにより、骨を再生させることを特徴とするものである。

本発明で用いる上皮系細胞としては、上皮系細胞であれば特にその種類は限定されないが、好ましくは、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞が挙げられる。これらの細胞は、1 種類の上皮系細胞から成る单一の細胞として培養あるいは分離後移植してもよいし、2 種類以上の上皮系細胞から成る細胞混合物として培養あるいは分離後移

植してもよい。

また、間葉系細胞としては、間葉系細胞であれば特にその種類は限定されないが、好ましくは、象芽細胞、歯髄細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞、又は間葉系の幹細胞等が挙げられる。これらの細胞は、1種類の間葉系細胞から成る単一の細胞として培養あるいは分離後移植してもよいし、2種類以上の間葉系細胞から成る細胞混合物として培養あるいは分離後移植してもよい。

上皮系細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、豚等）の歯胚、歯根膜（マラッセの上皮遺残）、口腔粘膜、付着上皮、皮膚等から公知の方法により採取することができる。例えば、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞等の上皮系細胞の場合、哺乳動物（例えば、ヒト、豚など）の下顎骨から採取することができる。埋伏歯を無菌的に取り出し、Hanks balanced salt solution (HBSS) 溶液などの適当な保存液で保存する。歯牙の中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を小片にして、HBSS溶液などを用いて組織を洗浄する。次いで、コラゲナーゼとディスペーザーを用いて組織を酵素処理することができる。酵素処理後、ピペッティング操作と遠心操作により細胞を回収することができる。得られた細胞を、培地として、例えばMCD B153 (kyokuto Co.) を用いて培養すると、歯胚中の間葉系細胞が失われ、上皮系細胞のみを得ることができる。

また、口腔粘膜上皮細胞の場合、ヒトより採取した口腔粘膜をディスペーザーで処理した後、上皮部分を剥がし、トリプシン処理することにより得ることができる。

間葉系細胞は、哺乳類（例えば、ヒト、豚など）の歯胚、歯髄、歯槽骨、骨髄等から公知の方法により採取することができる。例えば、歯胚中の間葉系細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、豚など）の下顎骨から採取することができる。埋伏歯を無菌的に取り出し、PBS溶液又はHBSS溶液などの適当な保存液で保存する。歯牙の中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を小片にして、PBS

溶液又はH B S S 溶液などを用いて組織を洗浄する。次いで、コラゲナーゼとデイスパーゼを用いて組織を酵素処理することが好ましい。酵素処理後、ピペッティング操作と遠心操作により細胞を回収することができる。得られた細胞を、培地として、Dulbecco's Modified Eagle Medium に 10 %牛胎児血清と 1 %抗生素を添加したものを用いて継代培養すると、歯胚中の上皮系細胞が失われ、間葉系の細胞のみを得ることができる。

また、歯牙からの歯髄の摘出は、例えば About I., 他 Experimental cell research. 258. 33-41, 2000 に記載の方法に従って行うことができる。無菌的に採取した歯髄を、シャーレに移し、培地中で培養することにより、間葉系細胞を得ることができる。

更に、公知の方法に従い、腸骨等から骨髄穿刺を行って骨髄を採取し、培養することで間葉系の幹細胞を得ることができる。

本発明の方法に従って再生した骨は、患者（即ち、骨の欠損又は損傷を有する患者）に移植することにより、該患者の治療のために用いられる。この場合、移植に伴う生体適合性などの観点から、再生に用いる細胞は、該患者に由来する自分の細胞を用いることが好ましいが、同種（他家）の細胞を使用することも可能である。また、歯胚を構成する細胞あるいは歯胚に分化する細胞を使用する場合は、親知らず（智歯）からも採取することができる。

また、歯牙は、発生から成熟するまでに 5 つの段階を経て形成されることが知られている。第一期は、Initiation stage と呼ばれ、基底膜に上皮組織と間葉組織が誘導される。第二期は、Bud stage と呼ばれエナメル器が作られる。第三期は Cap stage と呼ばれ、歯乳頭が形成され、歯胚が形成される。第四期は Bell stage と呼ばれ、歯胚からエナメル質を形成する細胞への分化と歯乳頭から象牙質と歯髄を形成する細胞への分化が開始される。第五期は Maturation stage と呼ばれ、エナメル質と象牙質と歯髄などの歯牙を構成する組織へと分化する。本発明においては、これらのうちのうちの好適な時期の細胞を採取して用いることができる。また、歯胚が存在していない症例では、歯根より歯髄を摘出して細胞を分離採取するこ

とができる。

細胞の培養は、動物細胞の培養に用いる通常の血清入り培地を用いて、通常の動物細胞の培養条件（例えば、室温から37℃の温度；5から10%CO<sub>2</sub>インキュベーター内など）の下で行なうことができる。また、上皮系細胞の培養には、無血清培地を使用して培養することも可能であるし、纖維芽細胞等のフィーダー細胞を共存させて培養することも可能である。

本発明において細胞の培養は担体上で行ってもよいし、担体なしで培養してもよいが、細胞は担体上で培養されることが好ましい。担体の使用は、細胞から骨を形成するのに有用である。担体としては、骨の形成に必要とされる時間を耐久することができ、かつその後、速やかに吸収されるものが好ましい。即ち、皮下、胃大網又は顎骨内などの生体内において適切な吸収速度と特性を有し、かつ細胞と高い親和性を有する材料から成る担体を使用することが好ましい。

担体の素材は、上記特性を満たすものであれば特に限定されないが、例えば、ポリグリコール酸 (polyglycolic acid (PGA))、ポリ (D L-ラクチド-コーグリコシド) (PLGA)、ポリ乳酸 (PLLA)、ポリカプロラクトンなどの合成高分子材料、またはコラーゲン、ゼラチン、フィブリンなどの蛋白質材料、あるいはヒアルロン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、象牙質、サンゴなどの天然由来材料を使用することもできる。さらに、リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP)などの無機材料も使用することができる。

PGAは、例えば Albany International Research Co. などから購入することができ、また PLGAはSigma から購入することができる。PGAの場合、吸収速度が速いため、ポリ (D L-ラクチド) (PLLA) を表面にコートして吸収期間を遅らせることもできる。さらに、PGA、PLLA、PLGAまたはポリカプロラクトンなどの合成材料を使用する場合には、細胞の接着及び増殖性を高めるために、表面にコラーゲン溶液又はフィブロネクチン溶液等をコートして使用することもできる。

上記の担体の形態としては、メッシュ形態、スポンジ形態、ゲル形態、不織布

形態などが可能である。

担体は細胞を移植しやすい形状に加工したものが好ましく、板状、球状の多孔体あるいは中空で一端が開放されており、周囲から血管が進入しやすくなっているものが好ましい。

担体は、目的に適合した形態のものを作製することが好ましい。このためには、目的とする形態をレジンで作製した後に印象材を用いて型を取得する。その後、レジンの型を取り出し、担体を構成する合成材料を流しこむことによって目的の形態を再現することができる。

本発明の方法では、上皮系細胞及び間葉系細胞を培養した後に、該上皮系細胞及び間葉系細胞を移植動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させてもよいし、該上皮系細胞及び間葉系細胞を直接患者の骨などに移植してもよい。好ましくは、細胞の培養の際に用いた担体も細胞と一緒に、移植動物の体内に移植される。

移植動物の種類は特に限定されないが、好ましくは哺乳動物であり、例えば、ラット（ヘアレスラットなど）、ウサギ又はマウスなどのげっ歯類動物を使用することができる。移植の部位としては、骨の形成に必要な因子を供給しやすい部位が好ましく、具体的には、血流の豊富な部位が好ましく、例えば、腹腔内の胃大網などが特に好ましい。このような部位に移植することにより、細胞の成長を促進することができ、骨の形成を早めることができとなる。

上記した本発明による骨の再生方法により再生した骨（細胞を培養して得られる骨、あるいはこの骨を移植動物に移植し、該移植動物の体内でさらに再生させた骨の何れでもよい）は、骨の欠損又は損傷を有する患者に移植することによって、該患者を治療することができる。即ち、本発明による骨の再生方法により得られた骨を用いる患者の治療方法も本発明の範囲内のものである。患者に移植された後も骨の成長を継続させることにより、さらに骨を形成させることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### 比較例 1：歯胚間葉系細胞のみの移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4°C の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10% 抗生剤入り Phosphate Buffered Saline (PBS) 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットにて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 10% 血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって細胞を回収した。

回収した間葉系細胞を DMEM 培地にて  $1.5 \times 10^7$  個 / 100 μl の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体（体積密度 50% ~ 60%, 厚さ 2mm、Albany International Research, MA, USA）に播種をした後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で静置培養を 24 時間行った。

移植動物としては、ヌードラット F344 を用いた。ヌードラットの腹部皮膚切開後、大網を引き出し、間葉系細胞を播種した担体を大網で包み縫合し、筋層、皮膚を縫合した。

移植後 1 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10% ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリンーエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 1 週で摘出した移植体は、直径が約 3.5 mm の組織であった（図 1）。

また、ヘマトキシリンーエオジン染色した組織を観察した結果、硬組織形成はほとんど見られなかった（図2）。

#### 比較例2：培養した歯胚間葉系細胞のみの移植

生後6ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは4°Cの冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生素入りPBS溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を120分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約2mmの小片にし、PBS溶液にて5回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを50分間酵素処理した。得られた組織を25ml用のピペットを用いて10分間ピペッティングした。25mlの上澄み液を遠心分離（1500rpm, 5分）して細胞を回収した。得られた細胞を10%血清入りDMEM 培地にて5回洗浄した後に遠心分離することによって細胞を回収した。

回収した細胞を DMEM 培地にて37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養を行い、必要な細胞数を獲得した。この細胞をトリプシン-E D T Aを用いて細胞培養用フラスコから剥離した後、PGAメッシュ担体に播種をした。37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で静置培養を行った。

移植動物としては、KSN/slC ヌードマウスを用いた。ヌードマウスの表皮を開いた後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに間葉系細胞を播種したPGAメッシュ担体を移植した。

移植後4週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリンーエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体のヘマトキシリニーエオジン染色した組織を観察した結果、硬組織形成はほとんど見られなかった（図 3）。

#### 実施例 1：歯胚上皮系細胞と歯胚間葉系細胞の混合移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4°C の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10% 抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。歯胚の中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した組織を 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットにて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離（1500rpm, 5 分）して細胞を回収した。得られた細胞を 10% 血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞の混合細胞を回収した。

回収した混合細胞を DMEM 培地にて  $1.5 \times 10^7$  個/100 μl の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体に播種をした。細胞を播種した担体は、静置培養を 24 時間行った。細胞の培養培地としては、DMEM に 10% 牛胎児血清と抗生剤を加えたものを用いた。また、細胞の培養は、37°C, 5% CO<sub>2</sub> という条件下で行った。

移植動物としては、KSN/slC ヌードマウスを用いた。ヌードマウスの表皮を開いた後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに細胞を播種した PGA メッシュを移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10% ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリニーエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、直径が約 10 mm の硬組織であった（図 4）。これは、比較例 1 で得られた間葉系細胞のみの場合の組織（ほとんど石灰化していない）に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマトキシリニーエオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された（図

5)。比較例 1 及び比較例 2 の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

#### 実施例 2：歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を播き分けて移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4°C の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10% 抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にした、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄したそれぞれの組織を 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットを用いて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 10% 血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって歯胚上皮系細胞及び歯胚間葉系細胞を各々回収した。

回収した間葉系細胞を DMEM 培地にて  $1.5 \times 10^7$  個/100 μl の細胞懸濁液に調整し、PGA メッシュ担体に播種をした。

一方、回収した上皮系細胞をタイプ I コラーゲンにて作成した溶液 (37°C でゲル化する溶液) にて  $1.5 \times 10^7$  個/100 μl の細胞懸濁液に調整した。

細胞を播種した PGA メッシュ担体は、静置培養を 1 時間行った後、上皮系細胞が懸濁されたコラーゲン溶液にてコーティングを行い、静置培養を 1 時間行った。

その後、充分量の DMEM 培地を加え、静置培養を 24 時間行った。細胞の培養は、37°C, 5%CO<sub>2</sub> という条件下で行った。

移植動物としては、KSN/sl<sup>c</sup> ヌードマウスを用いた。ヌードマウスの表皮を切開した後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに細胞を含むコラーゲンゲルにてコーティングを行った PGA メッシュ担体を移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10% ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリニエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、大きさが約 9 mm の硬組織であった（図 6）。これは、比較例 1 で得られた間葉系細胞のみの場合の組織（ほとんど石灰化していない）に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマトキシリニエオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された（図 7）。比較例 1 及び比較例 2 の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

### 実施例 3：歯胚間葉系細胞を口腔粘膜上皮細胞シートで包んで移植

生後 6 ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは 4°C の冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10% 抗生剤入り PBS 溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 溶液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットにて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離（1500rpm, 5

分)して細胞を回収した。得られた細胞を10%血清入りDMEM培地にて5回洗浄した後に遠心分離することによってそれぞれの細胞を回収した。

回収した歯胚間葉系細胞をDMEM培地にて $1.5 \times 10^7$ 個/100μlの細胞懸濁液に調整し、PGAメッシュ担体に播種をした後、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で静置培養を1時間行った。

ヒト口腔粘膜細胞を常法に従って培養することにより得られた口腔粘膜細胞シートにて歯胚間葉系細胞を播種したPGAメッシュを包み、24時間静置培養を行った。細胞の培養は、37°C、5%CO<sub>2</sub>という条件下で行った。

移植動物としては、KSN/slCヌードマウスを用いた。ヌードマウスの表皮を開いた後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに口腔粘膜細胞シートによりPGAメッシュを覆った担体を移植した。

移植後4週にて試料を採取した。摘出した試料は、10%ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリニーエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後4週で摘出した移植体は、大きさが約8mmの硬組織であった(図8)。これは、比較例1で得られた間葉系細胞のみの場合の組織(石灰化はほとんどしていない)に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマトキシリニーエオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された(図9)。比較例1及び比較例2の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

#### 実施例4：培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞の混合移植

生後6ヶ月の新鮮豚から下顎骨を採取した。実験に使用するまでは4°Cの冷蔵庫にて保存し、運搬中は氷上にて保存した。埋伏歯を無菌的に取り出し、10%抗生素入りPBS溶液にて保存した。

200PU/ml ディスパーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、取り出した埋伏歯を 120 分間酵素処理した後、埋伏歯をメスにて上皮系細胞が含まれる組織と間葉系細胞が含まれる組織に分離した。分離したそれぞれの組織中の石灰化した部分を取り除き、メスにて組織を約 2mm の小片にし、PBS 液にて 5 回洗浄した。

2mg/ml コラゲナーゼを DMEM 培地に溶解した酵素溶液を用いて、洗浄した間葉系細胞が含まれる組織のみを 50 分間酵素処理した。得られた組織を 25ml 用のピペットを用いて 10 分間ピペッティングした。25ml の上澄み液を遠心分離 (1500rpm, 5 分) して細胞を回収した。得られた細胞を 10% 血清入り DMEM 培地にて 5 回洗浄した後に遠心分離することによって細胞を回収した。

回収した細胞を DMEM 培地にて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行なった。この細胞をトリプシン-E D T A を用いて細胞培養用フラスコから剥離し、5×10<sup>6</sup> 個の細胞を得た。

一方、フィッシャー系ラットの表皮細胞を常法に従って採取、培養し、表皮細胞シート (75cm<sup>2</sup> 培養用フラスコ 2 枚分) を得た。得られた細胞シートをトリプシン-E D T A を用いて剥離し、ピペッティングにより細胞懸濁液を得た。

前記培養歯胚間葉系細胞と表皮細胞を混合して懸濁し、PGA メッシュ担体に播種した後、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下で静置培養を 24 時間行った。

移植動物としては、KSN/slC ヌードマウスを用いた。ヌードマウスの表皮を切開した後、筋層と表皮を剥離し、その空いたスペースに細胞を播種した PGA メッシュを移植した。

移植後 4 週にて試料を採取した。摘出した試料は、10% ホルマリン溶液にて固定し、常法に従ってパラフィンに包埋して連続組織切片を作成した。その後、切片にヘマトキシリノーエオジン染色を施し、組織学的に観察した。

移植後 4 週で摘出した移植体は、大きさが約 7 mm の硬組織であった(図 10)。これは、比較例 2 で得られた培養した歯胚間葉系細胞のみの場合の組織(石灰化はほとんどしていない)に比較して顕著に大きいことが確認された。また、ヘマ

トキシリニーエオジン染色した組織を観察した結果、組織中には骨様組織の形成が確認された（図11）。比較例1及び比較例2の結果からは硬組織の形成は認められておらず、また、これほど短期間に顕著な骨様組織の形成を観察した例はこれまで無いことから、上皮系細胞を添加したことにより、骨様組織の成長が促進されたものと考えられる。

#### 産業上の利用可能性

本発明の方法によれば、骨を効果的に再生することができる。

## 請求の範囲

1. 上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養することを含む、骨の再生方法。
2. 担体上で、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養することを含む、請求項1に記載の骨の再生方法。
3. 上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させることを含む、骨の再生方法。
4. 上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を担体と一緒に動物に移植し、該移植動物の体内で骨を再生させることを含む、請求項3に記載の骨の再生方法。
5. 上皮系の細胞として、内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞、間葉系細胞として、象牙芽細胞、歯髄細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞、又は間葉系の幹細胞を使用する、請求項1から4に記載の骨の再生方法。
6. 再生する骨が、顎骨もしくは歯槽骨である、請求項1から5に記載の骨の再生方法。
7. 請求項1から6の何れかに記載の方法により再生された骨。
8. 請求項1から6の何れかに記載の方法により再生した骨を、骨の欠損又は損傷を有する患者に移植することを含む、治療方法。
9. (1) 内エナメル上皮細胞、外エナメル上皮細胞、エナメル髄細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、マラッセの上皮遺残細胞、口腔粘膜上皮細胞、上皮細胞、表皮細胞又はこれらの前駆細胞から選択される上皮系細胞；  
(2) 象牙芽細胞、歯髄細胞、歯乳頭細胞、歯嚢細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞又はこれらの前駆細胞あるいは間葉系の幹細胞から選択される間葉系細胞；及び  
(3) 担体；

を含む、骨再生用組成物。

## 要約書

本発明の目的は、骨を効果的に再生する方法を提供すること、より具体的には、骨の欠損又は損傷を有する患者を治療することを可能にする骨の再生方法を提供することである。本発明によれば、上皮系細胞の共存下に間葉系細胞を培養及び／又は移植することを含む、骨の再生方法が提供される。

図 1

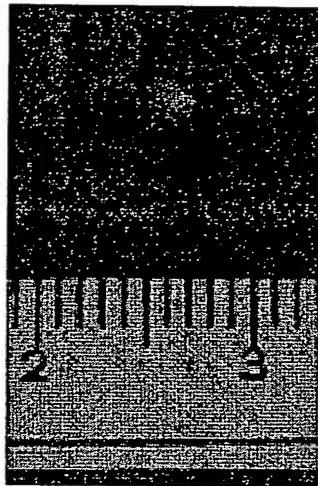


図 2

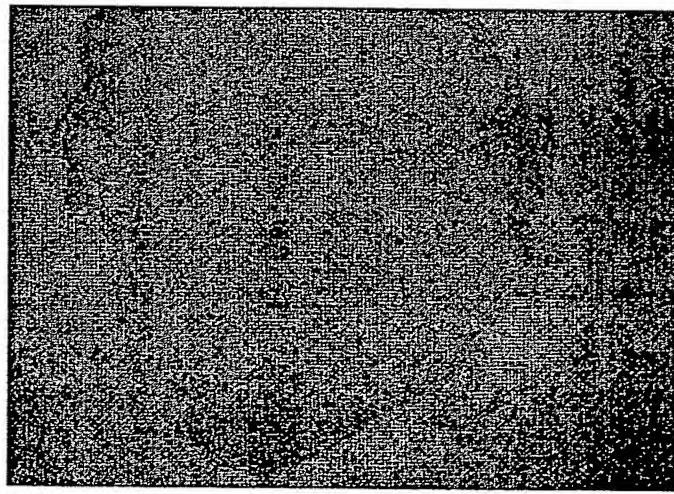


図 3

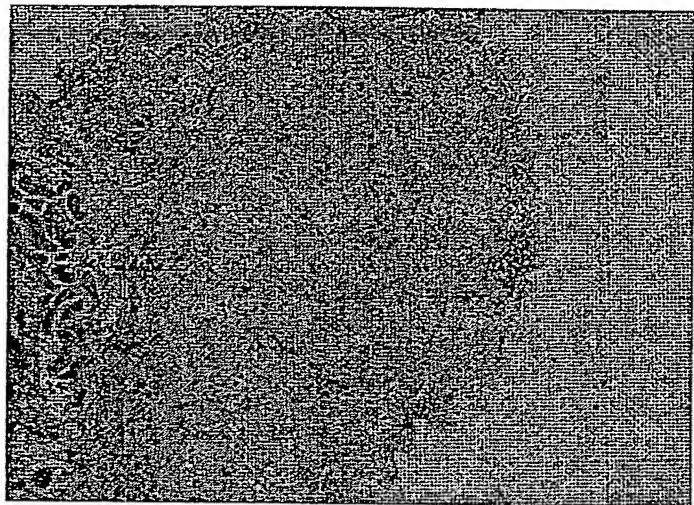


図 4

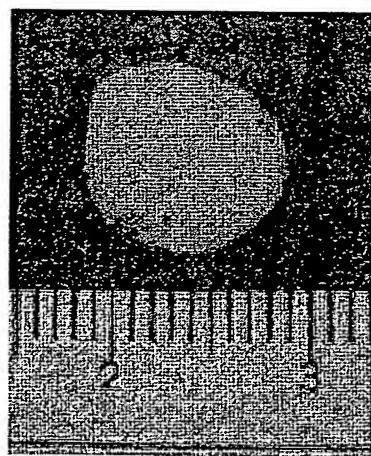


図 5

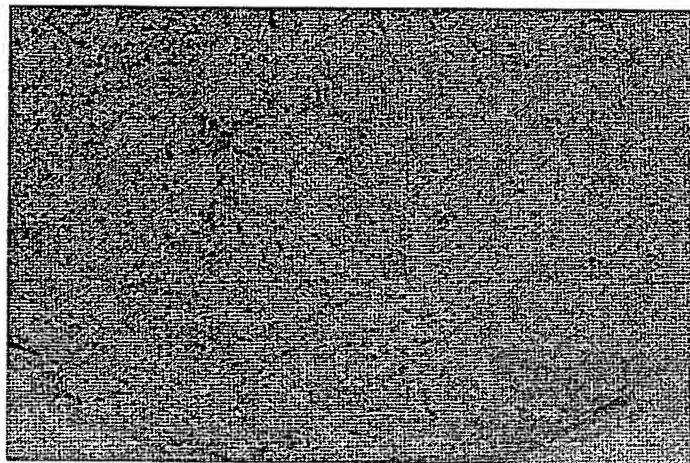


図 6



図 7

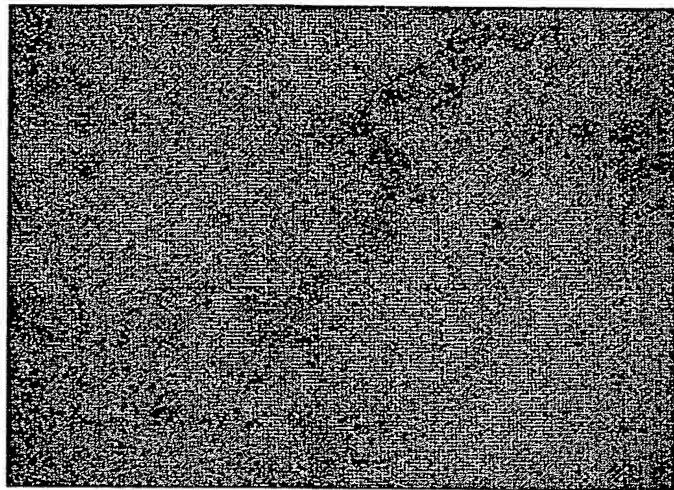


図 8

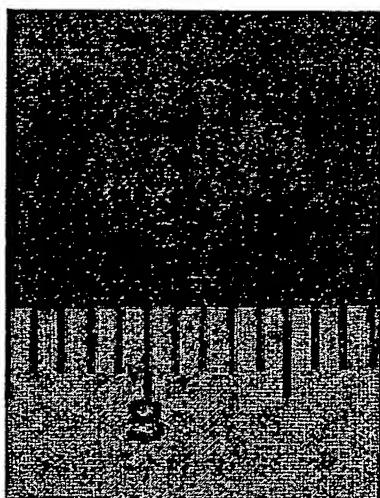


図 9

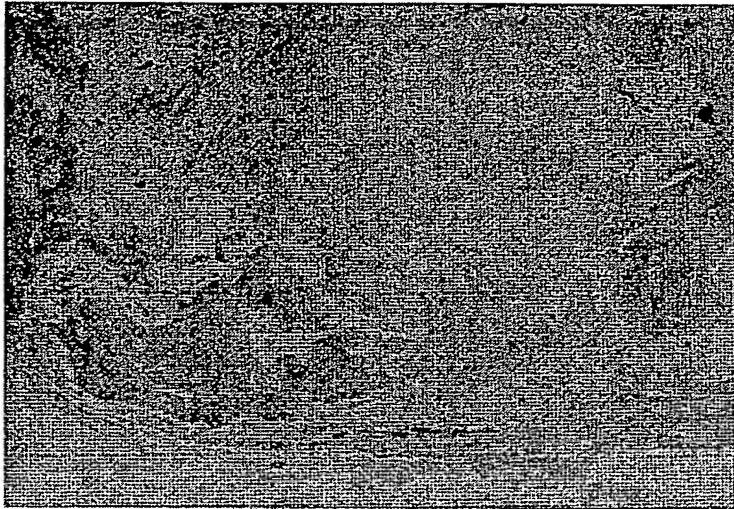


図 10

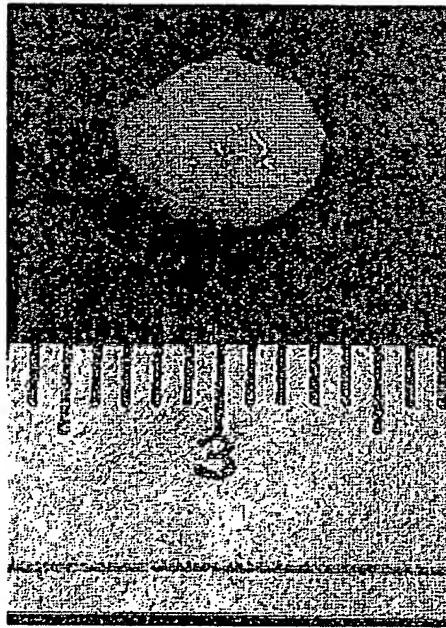


図 1 1

